

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月1日 (01.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/14047 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 39/395, A01M 1/02

B01D 69/02,

(74) 代理人: 藤野清也, 外(FUJINO, Seiya et al.); 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05548

(22) 国際出願日: 2000年8月18日 (18.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/234727 1999年8月20日 (20.08.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 旭化成工業株式会社 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒530-8205 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井出正一 (IDE, Shoichi) [JP/JP]; 〒882-0036 宮崎県延岡市桜園町34番地 東旭アパート414 Miyazaki (JP). 野田寿昭 (NODA, Toshiaki) [JP/JP]; 〒882-0051 宮崎県延岡市富美山町519番地6 Miyazaki (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FILTER MEMBRANES FOR PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

(54) 発明の名称: 生理活性物質溶液用濾過膜

(57) Abstract: Filter membranes to be used in efficiently eliminating pathogens such as viruses from solutions of drugs or physiologically active substances employed as starting materials thereof which are contaminated with pathogens such as viruses. These filter membranes, which can simultaneously achieve favorable performance of eliminating small viruses and a high physiologically active substance-permeability, can be obtained by controlling the membrane characteristics to give a ratio (BP/γ) of the bubble point BP (MPa) to the surface tension γ (N/m) of 110 or above, and/or logarithmic elimination ratios of swine parvovirus at 0 to 5 l/m² filtration and at 50 to 55 l/m² filtration of each 3 or above, and regulating the permeability for bovine immunoglobulin, wherein the monomer content amounts to at least 80%, to 70% or above. These filter membranes make it possible to provide drugs or starting materials therefor with little fear of the contamination with viruses, etc. and, therefore, are useful in the fields of pharmacy, medicine and the like.

[続葉有]

WO 01/14047 A1



(57) 要約:

ウイルス等の病原物質を含む医薬品またはその原料としての生理活性物質溶液から、ウイルス等の病原物質を効果的に除去するために用いる濾過膜を提供する。

濾過膜の特性を、バブルポイントBP (MPa) と界面張力 γ (N/m) との比 (BP/ γ) が110以上にするか、及び/または0~5リットル/m²濾過時と50~55リットル/m²濾過時におけるブタパルボウイルス対数除去率をいずれも3以上にして、かつ、単量体の占める割合が80%以上のウシ免疫グロブリンの透過率を70%以上にするにより、小ウイルスの高い除去性能と生理活性物質の高い透過性能を同時に達成できる生理活性物質溶液用濾過膜が提供できた。

本発明の濾過膜により、ウイルス等の混入の危険性が少ない医薬品、もしくはその原料を提供できるので、医薬、医療などの分野で有用である。

明 細 書

生理活性物質溶液用濾過膜

[技術分野]

本発明は、医薬品またはその原料としての生理活性物質溶液から、ウィルス等の病原物質を効果的に除去するために用いる濾過膜に関する。

[背景技術]

近年、血漿分画製剤やバイオ医薬品の精製工程に、製剤の投与によって発生するかもしれないウィルス感染に対する安全性を付加する技術が用いられている。そのための技術としては、ウィルスを不活化する方法または除去する方法が採用されている。ウィルスを不活化する方法には、加熱処理法や化学薬品処理法（例えば、Solvent/Detergent (S/D) 処理）等があり、ウィルスを除去する方法には、膜濾過法がある。膜濾過法は、ふるいわけ原理により、粒子の大きさに応じて分離操作を行うので、ウィルスに関しても、その化学的特性や熱的性質に拘わらず、大きさのみに応じて、ウィルスを除去できる。したがって、近年、ウィルス除去膜による膜濾過法の工業的な実用化が広まっている。

特に、耐熱性のヒトパルボウィルス B19 や A 型肝炎ウィルス等に対しては、加熱処理法は効果が小さい。脂質膜を持たないヒトパルボウィルス B19、ポリオウィルス、レオウィルスや SV40 等には Solvent/Detergent (S/D) 処理法も、原理的に効果がない。特に、ヒトパルボウィルス B19 は、耐熱性ウィルスであり、かつ脂質膜を持たないウィルスであるため、これを除去・不活化する手段として、ウィルス除去膜が有効性をもたらす。

一方、血漿分画製剤やバイオ医薬品の精製工程では、ウィルス除去・不活化能力を高めると同時に、生理活性物質の高透過が要求されることは言うまでもない。

現存するウィルス除去膜は、ヒト免疫グロブリンや血液凝固第Ⅷ因子等の高分子量の生理活性物質は高透過するが小ウィルス除去性能が低い膜であるか、もしくは、小ウィルスは除去できるがヒト免疫グロブリンや血液凝固第Ⅷ因子等の高分子量の生理活性物質は実用的レベルで高透過しない膜のいずれかであ

る。

すなわち、従来の濾過膜は、ヒト免疫グロブリンや血液凝固第Ⅷ因子等の高分子量の生理活性物質は高透過するがヒトパルボウイルスB 19等の小ウイルスは除去できないという欠点を有しているか、或いは、ヒトパルボウイルスB 19等の小ウイルスは除去できるがヒト免疫グロブリンや血液凝固第Ⅷ因子等の高分子量の生理活性物質は実用的レベルで高透過しないという欠点を有している。

例えば、特開平7-265674号公報には、小さな粒子を液体から効果的に除去し、最小の吸着性を示しかつ実際の使用前に完全性を試験しうるポリフッ化ビニリデン膜が記載されている。この膜は、溶液からのウイルス除去には有用であると記載されているが、同時に高分子量の生理活性物質を高透過率で透過できるかどうかは不明である。

高分子多孔質中空糸膜は、特許第1873816号明細書、および米国特許第4,808,315号明細書に開示されている。これらの中空糸膜は、生理活性物質溶液からのウイルス除去に有効な特有の細孔構造を有する中空糸膜である。これらの中空糸膜は、ウイルスの高除去性と生理活性物質の高透過性を同時に発揮する特有の細孔構造を特徴としているが、ヒト免疫グロブリンや血液凝固第Ⅷ因子等の高分子量の生理活性物質とヒトパルボウイルスB 19やポリオウイルス等の小ウイルスのふり分けの場合も、有用であるかどうかについては記載もなければ示唆もない。

特表平4-505579号公報には、溶液からのウイルス分離のための膜が記載されている。その膜は、ウイルスを含む溶液からウイルスを選択的に分離する複合不整膜である。この膜は、バクテリオファージΦX174 (28 nm) の対数除去率3以上であり、ヒトパルボウイルスB 19やポリオウイルスのような小ウイルスの対数除去率は3以上であるが、ヒト免疫グロブリン透過率は10~20%と極めて低く、実用に供しえないものである。

さらにまた、生理活性物質とヒトパルボウイルスB 19等の小ウイルスを選択的に分離しようとする従来の濾過膜では、濾過を持続して濾過量が増加してくると、ウイルス除去能が低下してくるという問題点があった。特に初期のウイルス除去能に優れている濾過膜では、濾過量と共にウイルス除去能が急激に低下する傾向があり、実用上問題があった。

[発明の開示]

本発明は、上記のような従来技術の問題点を解決するものである。すなわち、本発明は、ウィルス混入の危険性のある医薬品またはその原料としての生理活性物質溶液から、生理活性物質溶液を実用的レベルで透過させ、かつ、ヒトパルボウィルス B 19 やポリオウィルスのような小ウィルスの除去を行うことができ、しかも、その特性が濾過量によって実質的に変化しないで持続できる濾過膜を提供することを課題とする。そして、その結果、より安全な製剤をもたらす技術を提供することを課題とする。

本発明者らは、前記課題を解決するため、鋭意努力した結果、本発明に至った。

即ち、本発明は、バブルポイント BP (MPa) と界面張力 γ (N/m) の比 (BP/γ) が 110 以上であり、かつ、単量体の占める割合が 80% 以上であるウシ免疫グロブリンの透過率が 70% 以上であることを特徴とする生理活性物質溶液用濾過膜に関する。

また、本発明は、 $0 \sim 5$ リットル/ m^2 濾過時と $50 \sim 55$ リットル/ m^2 濾過時におけるブタパルボウィルス対数除去率がいずれも 3 以上であり、かつ、単量体の占める割合が 80% 以上であるウシ免疫グロブリンの透過率が 70% 以上であることを特徴とする生理活性物質溶液用濾過膜に関する。

さらに、本発明は、 BP/γ が 110 以上で、 $0 \sim 5$ リットル/ m^2 濾過時と $50 \sim 55$ リットル/ m^2 濾過時におけるブタパルボウィルス対数除去率がいずれも 3 以上であり、かつ、単量体の占める割合が 80% 以上であるウシ免疫グロブリンの透過率が 70% 以上であることを特徴とする生理活性物質溶液用濾過膜に関する。さらにまた、本発明では、上記の濾過膜の膜内部の孔構造において、孔径の対数標準偏差 σ_g が 2.0 以下である領域部の厚みが $3 \mu m \sim 90 \mu m$ であるか、純水透過速度が膜面積 $1 m^2$ 当たり $70 \sim 200$ リットル/ h / $0.1 MPa$ であれば、さらに好適であること、及び、膜表面にスキン層を持たず、厚さが $5 \mu m \sim 100 \mu m$ であるのが適当であることを見出した。

本発明の膜の孔径特性は、 BP/γ 及び/またはブタパルボウィルス対数除去率と、単量体の占める割合が 80% 以上であるウシ免疫グロブリンの透過率とにより表すことができる。

ここで、 BP/γ とブタパルボウィルス対数除去率は、いずれも、濾過膜の孔構造を知るための指標となるものである。 BP/γ は、濾過初期における膜

孔構造と関係する一方、ブタパルボウイルス対数除去率は、濾過初期における性能のみでなく、濾過性能の持続が関係する指標である。

濾液中のウイルス濃度は、濾過量によって変わってくることがある。ウイルス捕捉容量が少ない膜では、濾過量が増えるに従ってブタパルボウイルス対数除去率の低下が起きてしまう。一方、ブタパルボウイルス対数除去率の低下がないかあるいは少ない膜は、ウイルス捕捉容量が多い膜である。さらに、膜内部の孔構造において、一定程度以上の均質性を有する領域が多く存在すれば、ウイルス捕捉容量が多くなり、したがって、ブタパルボウイルス対数除去率の持続性に優れるという特徴を有することになる。そこで、本発明で、 $0 \sim 5$ リットル/ m^2 濾過時と $50 \sim 55$ リットル/ m^2 濾過時との両方のブタパルボウイルス対数除去率がいずれも 3 以上であるということは、膜の持続特性、膜の孔構造特性、ウイルス捕捉容量、および膜の均質性の程度を表わす指標となるものである。濾過膜の孔構造を知るための手段の一つとして、界面破壊現象が用いられる。バブルポイント試験法は膜の持つ最大孔径を決めるための簡便な方法として用いられている。この方法は、Bechold らによって、すでに用いられたものである（例えば、H. Bechold ら、Kolloid Z., 55, 172 (1931)、J I S K3832）。

この方法の概略は、膜を界面張力 γ (N/m) の液体で湿潤させた後、その膜に、気体で徐々に圧力をかけていくと、ある圧力で膜表面から連続的に気泡が発生するようになるので、この時の気体圧力を測定するというものである。このときの気体圧力をバブルポイント BP (MPa) と呼んでいる。

公知の測定方法はいずれも、連続気泡の発生を目視確認した時点での圧力をバブルポイントとしている。しかし、この判定法は、膜面積が小さい場合には気泡の発生量が少なく、見過ごす恐れがあること、および、加圧以前から膜表面に付着していた気泡（界面破壊現象によって生じたものではない）の膜表面からの離脱を界面破壊現象による気泡であると見誤る恐れがあることから、誤差が出易い。

本発明では、より測定誤差を小さくするために、 1 cm^2 当たりたり 3.0 ml/min の定量的な連続気泡の発生があった時点の圧力 (MPa) をもってバブルポイント BP と定義した。

本発明者らは、BP/ γ がヒトパルボウイルス B19 の除去と相関があることを見出した。詳細には、BP/ γ が 110 以上を有する孔径特性の膜は、ヒトパルボウイルス B19 を効率良く除去できることを見いだした。

濾過膜の孔構造を間接的に知るために、粒子の除去性能を解析する方法が用いられる。除去性能を具体的に表現する方法としては、膜の平均孔径に近い平均粒子径と、できるだけ狭い粒子径分布を有するモデル粒子の除去率を用いることが一般的である。

本発明の技術領域においては、そのような特性を持つ粒子として特定のウイルスやファージが用いられる。ブタパルボウイルスは平均20～25nmの粒子径を有し、凝集していない状態ではその粒子径分布も極めて小さく、かつヒトへの感染の恐れがないことから、特に本発明の適用分野においては好適なモデル粒子である。

本発明では、BP/γに基づいて、ヒトパルボウイルスB19等のヒト感染性の小ウイルスの除去率を予測することも可能である。また、本発明では、ヒトパルボウイルスB19と粒子径その他の特性が類似しているブタパルボウイルスの除去率から、ヒトパルボウイルスB19等のヒト感染性の小ウイルスの除去率を予測することもできる。

ブタパルボウイルスの除去率は対数除去率（LRV）で表し、以下の式を用いて計算した。

$$LRV = \log_{10} (N_0 / N_f)$$

N_0 : 濾過前の濾過元液中のブタパルボウイルス濃度

N_f : 濾過後の濾液中のブタパルボウイルス濃度

本発明ではブタパルボウイルスの対数除去率は、0～5リットル/㎡濾過時と50～55リットル/㎡濾過時との両方で3以上であることが必要である。

このウイルス濾過は、濾過圧力0.0785MPa、濾過温度25℃、定圧デッドエンド濾過の条件で行う。濾液中のウイルス濃度は、濾過量で変わってくることもある。本発明でブタパルボウイルスの対数除去率（LRV）が3以上であるということは、上記濾過操作において0～5リットル/㎡濾過時の濾液に関するLRV、および50～55リットル/㎡濾過時の濾液に関するLRVのいずれもが3以上であると定義する。

濾過量が増えるに従いLRVの低下が起きる膜は、ウイルス捕捉容量が少ない膜であり、LRVの低下がないあるいは少ない膜は、ウイルス捕捉容量の多い膜である。したがって、2点のLRVは、膜構造特性を表わすとも考えることができる。

従来技術の膜では、生理活性物質溶液を実用的レベルで濾過させ、かつ、ヒトパルボウイルスB 19やポリオウイルスのような小ウイルスの除去で、このLRVの持続性に優れた膜を作製することは、困難であった。

本発明の膜は、膜内部の孔構造において、一定程度以上の均質性を有する領域の存在が多いために、小ウイルス除去においても、LRVの持続性に優れた特徴を有している。前記のブタパルボウイルスの対数除去率を求めるための濾過元液には、3%牛胎児血清を含むダルベッコMEM培地溶液で培養したESK細胞（ブタ腎臓細胞）に、ブタパルボウイルスを感染させた時の培養上清を用いた。

濾過元液と濾液中のブタパルボウイルス濃度の測定は、それぞれの液をESK細胞に加えて10日間培養した後、ニワトリ新鮮赤血球の凝集反応を利用して、TCID₅₀測定法により行った。

ヒトパルボウイルスB 19の濃度測定（アッセイ）については、細胞変性の観察等による一般的な手法が確立されていない。PCR法による濃度測定（アッセイ）が利用される場合もあるが、感度が充分でないため、ウイルス除去率についても、精度のよいデータを得ることは困難である。従って、ヒトパルボウイルスB 19の除去ないしは不活化方法の有効性を推定する手段として、細胞変性観察による感度の高いアッセイ法が確立されているブタパルボウイルスやイヌパルボウイルスを用いた評価が行われている。実際にブタパルボウイルスやイヌパルボウイルスを用いた評価法によってヒトパルボウイルスB 19の不活化ないしは除去に有効であると判断された手法が、製剤製造工程に採用されて、実用的な性能を発揮している。

生理活性物質の膜透過において、透過率が低いということは、生理活性物質による膜の孔構造中への閉塞が激しいことと同義である。膜の孔構造の閉塞は、膜中に捕捉され、ロスとなる生理活性物質の増加、濾液中の生理活性物質濃度の低下、単位膜面積当たりの濾過可能量の低下等をもたらし、製剤製造工程におけるコストの増加要因となる。これらの観点から、製剤製造工程での膜濾過における生理活性物質の透過率は70%以上、好ましくは80%以上が工業生産の実用レベルであるとされている。

生理活性物質の透過率は、物質の種類、溶液の性状により異なるが、ヒト免疫グロブリンは、分子量が160,000～900,000と、一般的に医薬や医療分野において実用化されている生理活性物質の中では最大の領域にあ

り、かつ凝集性が高いので、透過性を向上させることが困難であるとされている。

ところで、実際のヒト血液を原料とする血漿分画製剤製造工程では、エタノールとの親和性の差によって血漿蛋白成分を分画するコーン分画法やクロマトグラフィー処理等の複数の精製処理を経た後に、得られたヒト免疫グロブリンに対して、濾過膜によるウイルス除去が施行されるのが通常である。

濾過前のヒト免疫グロブリンは、夾雑物あるいは多量体の含有量の少なさの観点からみると、ウシ免疫グロブリン以上であると考えられる。従って、ウシ免疫グロブリンに関して高透過率であるということは、ヒト免疫グロブリンに関する透過率も、同等以上のレベルであると容易に推測できる。単量体の占める割合が80%以上であるウシ免疫グロブリンに対する透過率が70%以上である本願発明の膜は、医薬品またはその原料としての生理活性物質全般の濾過において、上記の製剤製造工程におけるコストの観点から、有意な効果をもたらすものである。

ウシ免疫グロブリン透過率は、以下のようにして求めた。

$$\text{ウシ免疫グロブリン透過率} = C_f / C_o \times 100$$

C_f : 濾過前（元液）のウシ免疫グロブリン濃度

C_o : 濾液後（濾液）のウシ免疫グロブリン濃度

このウシ免疫グロブリン透過率を求めるための濾過は、濾過圧力0.0785 MPa、濾過温度25℃、定圧デッドエンド濾過の条件で行う。

Life Technology社のウシ免疫グロブリン溶液を、0.15 N NaClで希釈して3wt%とし、旭化成工業（株）製のPLANOVA 35Nで前濾過して夾雑物を除いたものをウシ免疫グロブリンの濾過元液として用いた。この時、濾過元液中のウシ免疫グロブリンの分子量分布を液体クロマトグラフィーを用いて測定したが、単量体の占める割合は80%以上であった。

この濾過元液を、分離膜で3時間濾過して得られたものを濾液とした。

濾過元液と濾液中のウシ免疫グロブリン濃度の測定は、紫外線分光光度計を用いて280nmの吸光度を測定して算出した。

ウイルス除去膜を用いて、生理活性物質等の小粒子とウイルス等の大粒子をふるいわけ原理によって分離する際に実質的に有効なのは、孔径が、それら2種の粒子の大きさの中間にある孔である。そのような一定範囲の大きさの孔が

充分な有効性をもつためには、膜内部の孔構造に関して、一定以上の均質性を有する領域が存在することが不可欠である。すなわち、本発明では、膜内部の孔構造において、孔径の対数標準偏差 σ_g が 2.0 以下である領域部の厚みは、 $3\mu\text{m} \sim 90\mu\text{m}$ が好ましく、 $15\mu\text{m} \sim 50\mu\text{m}$ がより好ましい。この均質性を直接測定する手段として電子顕微鏡を用いた孔径測定がある。

上記の膜内部の孔構造を有している本発明の膜は、一定以上の均質性を有する領域が多いために、濾過初期のみでなく濾過を持続した後にもブタパルボウィルス対数除去率が高く、同時に、ウシ免疫グロブリンを高透過させることがわかった。

孔径の対数標準偏差 σ_g が 2.0 以下である領域部の厚みが大きいほど、ブタパルボウィルス対数除去率は当然高くなる。しかし、大きくなりすぎると、ウシ免疫グロブリンの透過性の点で不利になる。

孔径の対数標準偏差 σ_g は、以下の式で求める。

$$\ln \sigma_g = ((\sum \Delta n_i (\ln D_{pi} - \ln D_{pg})^2 / N)^{1/2}$$

$$\ln D_{pg} = \sum \Delta n_i \ln D_{pi} / N$$

Δn_i : 孔径 D_{pi} の孔数

D_{pi} : 孔径 (nm)

D_{pg} : 対数平均孔径 (nm)

N : 全孔数

膜の孔径の測定は、電子顕微鏡によって行う。膜を、アクリル樹脂のような高分子の樹脂に包埋する。包埋した膜を、膜横断面が見えるように、通常の方法で薄く切り出して切片を作成する。切り出した膜横断面を、走査型電子顕微鏡 (SEM) で写真撮影する。撮影した写真を画像処理解析する。この時、膜横断面を厚み方向に分割して、各分割領域毎に孔径 (D_{pi}) と孔の数 (Δn_i) を求める。ここで言う孔径とは、走査型電子顕微鏡写真で読み取れる孔を真円に換算した時の直径である。

本発明において適当な純水透過速度は膜面積 1m^2 当たり $70 \sim 200$ リットル/h/0.1MPa が好ましく、 $90 \sim 120$ リットル/h/0.1MPa がさらに好ましい。膜中のすべての大きさの孔が寄与して決定される純水透過速度を、膜面積 1m^2 当たり 70 リットル/h/0.1MPa 以上とすることにより、生理活性物質溶液の濾過量や透過率を実用的な高いレベルにできる。特に、生理活性物質溶液の濾過量を多く出せる利点が高い。また、膜中のす

すべての大きさの孔が寄与して決定される純水透過速度を、膜面積 1 m^2 当たり $200 \text{ リットル/h/0.1 MPa}$ より大きくすると、 $0 \sim 5 \text{ リットル/m}^2$ 濾過時と $50 \sim 55 \text{ リットル/m}^2$ 濾過時におけるブタパルボウィルス対数除去率をいずれも3以上にすることは困難であることも分かった。

ここでいう純水透過速度とは、温度 37°C の純水を 0.1 MPa の膜間差圧で濾過して出てくる純水の速度を、膜面積 1 m^2 当たり リットル/h/0.1 MPa の単位で表示した値である（この場合、膜面積は、乾燥状態での膜面積をいう）。また、純水とは、限外濾過により精製した水をいう。

本発明にいうスキン層とは、膜の片側ないしは両側の表面に存在する、膜内部の部分に比して、緻密な構造を有する極めて薄い層をいう。一般に、表面のスキン層によって濾過特性を担っている膜でも、純水透過速度を、膜面積 1 m^2 当たり $70 \text{ リットル/h/0.1 MPa}$ 以上の膜性能を実現できるが、 $0 \sim 5 \text{ リットル/m}^2$ 濾過時と $50 \sim 55 \text{ リットル/m}^2$ 濾過時におけるブタパルボウィルス対数除去率がいずれも3以上の膜を得ることは困難である。その理由は、スキン層は、常に欠陥、たとえばピンホール、亀裂等の欠陥を有し、ウィルス除去率に確実性が得られないからである。

本発明の膜の適切な膜厚は、 $5 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ である。好ましくは $20 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ である。本発明の膜を製造する際、膜内部領域での凝固速度が、膜表面からの距離に依存して大きく異なってくることから、膜厚を $100 \mu\text{m}$ より大きくすると、膜内部領域の孔構造を制御することが困難になる。この為、膜厚は、 $100 \mu\text{m}$ 以下とすることが好ましい。また、 $0 \sim 5 \text{ リットル/m}^2$ 濾過時と $50 \sim 55 \text{ リットル/m}^2$ 濾過時におけるブタパルボウィルス対数除去率をいずれも3以上とする為には、膜厚はある程度厚いことが必要あり、 $5 \mu\text{m}$ 以上とすることが好ましい。

本発明でいう膜とは、ウィルス除去するウィルス除去膜、限外濾過膜、精密濾過膜等であり、膜の素材は、再生セルロース、ポリフッ化ビニリデン、ポリスルホン、ポリアクリロニトリル等が例示されるが、それ以外の素材も含まれる。また、膜の形態は、中空糸膜、平膜、プリーツ膜、スパイラル膜のいずれでも良い。また、膜を重ね合わせた、いわゆる複合膜でも良い。

本発明でいう生理活性物質とは、医薬、医療、診断薬の領域で使用されている生理活性物質であり、具体的には蛋白質、ポリペプチドおよびポリサッカライド類またはその組み合わせなどがある。これらの生理活性物質の起源はヒト

又は動物又は培養細胞由来のものである。遺伝子組み換え、または細胞融合技術を使って培養動物細胞で産生される生理活性物質、トランスジェニック技術により動物の分泌組織で生産させた生理活性物質等も含む。

蛋白質は、例えば血液凝固因子である F-IX, F-XI, F-VIII, F-VII, フィブリンノーゲン, トロンビン, アンチトロンビン-III, 又はこれらの混合物、ヒト免疫グロブリンである IgG, IgA, IgD, IgE 又は IgM, アルブミン、 α -1 プロテアーゼインヒビター、トリプシンインヒビター、プロテアーゼインヒビター、ストレプトキナーゼ、アポリポ蛋白質、及び成長因子等である。ポリペプチドは、例えば哺乳動物細胞で生産された遺伝子組み換えヒト成長ホルモン、牛組織由来プロテアーゼインヒビター等の生理活性ポリペプチドである。ポリサッカライド類は、例えばグリコサミノグリカンであるヘパリン、ヘパリン断片、ヘパリン誘導体、硫酸ヘパラン及びヒアルロン酸である。

特にヒト免疫グロブリン製剤は、溶液中の濃度が高いことから、一般に、膜透過において透過性が低く、ヒトパルボウイルス B 19 やポリオウイルス等の除去との両立が困難である。しかし、本発明によると、透過性が高く、ヒトパルボウイルス B 19 やポリオウイルス等の除去率も高いので好適である。従って、本発明で効果が著しく好ましい生理活性物質はヒト免疫グロブリンである。

なお、濾過する生理活性物質の溶液は、透過性を考慮し、目詰まりし難い条件で行うことが経済性の観点からも実用上好ましいのは言うまでもない。

特にヒト免疫グロブリンでの蛋白質濃度は、特に制限がないが、5 w t % 以下が実用上好ましく、3 w t % 以下がより好ましい。

各種の高分子を用いて、本発明の膜を製造する方法としては、非溶媒誘導や熱誘導による相分離法が多く用いられる。そのいずれにおいても、製膜原液中の膜素材ポリマー濃度、相分離・凝固段階での化学変化における平衡論的要素及び速度論的要素を調整することにより、目的とする膜構造を形成することができる。

より具体的に説明すると、二重紡口を用いて中空糸膜を製造する際には、製膜原液中の膜素材ポリマー濃度、内液組成、外液組成、製膜原液の吐出速度、膜の巻き取り速度などの製膜時の化学平衡論的及び速度論的要素によって、膜構造が異なってくる。吐出速度、及び巻き取り速度が低ければ、孔径分布が狭くなり、均質な孔径を有する膜の有効領域も厚くなるが、吐出速度、及び巻き取り速度を低くしすぎるのは、製造効率が悪くなり実用的ではない。そこで、

吐出速度、及び巻き取り速度を実用レベルの一定の値にするときには、製膜原液の膜素材ポリマー濃度、内液及び外液組成を調整することにより、膜構造を変化させることができる。内液と外液との非溶剤の濃度を低くすると、膜内部の実質的な分離に寄与する領域の孔径分布を狭く、さらにこの領域部の厚みをより厚くできるので、 BP/γ が高く、ブタバルボウイルス対数除去率が高くなる傾向がある。

以下、本発明の濾過膜を製造する方法を、銅アンモニア法再生セルロースの中空糸膜を例にとって詳細に説明する。公知の方法(例えば、特開昭59-204912号公報、特開昭59-204911号公報)により、セルロース銅アンモニア溶液及びマイクロ相分離を生起させる非溶媒を含む水溶液(以下凝固液)を調製する。すなわち、膜素材としてセルロースを用い、銅アンモニア溶液に溶解して、セルロース濃度が、7.0～8.0wt%程度のセルロース銅アンモニア溶液を調製する。凝固液は中空糸外部から作用させる外液と中空糸内部に導入して作用させる内液の2種類があるが、外液組成はアセトン濃度が20～35wt%程度、アンモニア濃度が0～0.1wt%程度、内液組成はアセトン濃度が30～50wt%程度、アンモニア濃度が0～0.5wt%であることが好ましい。本例は非溶媒誘導による製膜法であり、この場合の非溶媒はアセトンであるが、凝固液組成はマイクロ相分離を生起させる非溶媒の濃度を低くすることが好ましい。非溶媒の濃度を低くする方が、膜内部領域の孔径分布を狭くして、さらにこの領域部の厚みをより厚くできるからである。

上記のように調製したセルロース銅アンモニア溶液及び凝固液を用いて、特開平4-371221号公報に示す方法により、紡糸、凝固、再生、水洗、真空乾燥を経て、中空糸膜を得る。

[発明を実施するための最良の形態]

以下に、本発明の実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

[実施例1～3]

特開昭59-204912号公報に開示されている方法により、セルロース銅アンモニア溶液及び凝固液を調製し、特開平4-371221号公報で開示される方法と同様の方法により、中空糸膜を製造した。すなわち、コットンリッター(平均分子量 1.44×10^5)を公知の方法で調製した銅アンモニア

溶液中に溶解し、セルロース濃度 7.5 wt % の紡糸原液とした。該紡糸原液を、環状二重紡口の外側紡出口より吐出し、同時に、第 1 表に示す組成の内液を該紡口の中央吐出口より吐出した。原液吐出速度は、第 1 表に示した。これを、第 1 表に示す組成の外液中に導入して、巻き取った。巻き取り速度は 10 m / 分であった。

ここで、セルロース濃度、外液組成及び内液組成を調整することにより、膜内部の孔構造を制御することができ、本発明の膜を得ることができる。

この凝固工程の凝固浴は、特開平 4 - 3 7 1 2 2 1 号公報に記載される U 字型細管を用いた。さらに、巻き取った中空糸膜を特開平 4 - 3 7 1 2 2 1 号公報に開示された方法で硫酸水溶液で再生、水洗し、最後に真空乾燥させた。このようにして得られた中空糸膜を、ポリウレタン系接着剤を用いて通常の方法でフィルターに組み立てた。

得られた中空糸膜の内径、膜厚、 BP/γ 、純水透過速度、ブタパルボウィルス LRV、ウシ免疫グロブリン透過率を第 1 表に示す。ここで、バブルポイント、純水透過速度、ブタパルボウィルス LRV、ウシ免疫グロブリン透過率は、前述した方法で測定した。さらに、本実施例のバブルポイント測定は、界面張力 γ が 0.012 (N/m) であるパーフルオロカーボンを湿潤液体として、膜の耐圧範囲で測定可能な低圧力試験条件を作りだし、気体には窒素を用いた。

実施例 1、2、3 の膜は、電子顕微鏡観察の結果、いずれも膜表面にスキン層を有していなかった。

[表 1]

		実施例 1	実施例 2	実施例 3
セルロース濃度(wt%)		7.5	7.5	7.5
外液組成	アセトン濃度(wt%)	30	25	30
	アンモニア濃度(wt%)	0	0	0
内液組成	アセトン濃度(wt%)	40	45	40
	アンモニア濃度(wt%)	0	0.65	0
原液吐出速度 (ml/min)		3.65	3.65	3.00
内径 (μm)		404	414	396
膜厚 (μm)		32	30	25
BP/ γ (MPa / (N/m))		120	135	115
純水透過速度 *1)		107	97	118
ブタパルボウイルスLRV*2)		5.1	>6.0	4.1
ブタパルボウイルスLRV*3)		4.2	>6.0	3.1
ウシ免疫グロブリン透過率 (%)		>90	>90	>90

* 1) 膜面積 1 m^2 あたりリットル/h/0.1 MPa

* 2) ウィルス溶液濾過量 0~5 (リットル/ m^2)

* 3) ウィルス溶液濾過量 50~55 (リットル/ m^2)

実施例 1 の膜の、膜厚方向に測定した空孔率と孔径分布の対数標準偏差 σ_g を第 2 表に示す。実施例 1 の膜は、対数標準偏差 σ_g が 2.0 以下である領域部の厚みが $20\text{ }\mu\text{m}$ (膜厚の 63% を占めている) であった。

[表 2]

膜厚方向の領域部位 (%)	空孔率 (%)	対数標準偏差
0~12	51	2.48
12~25	29	2.08
25~37	20	1.82
37~49	27	1.88
49~62	27	1.86
62~75	26	1.79

75～88	20	1.82
88～100	35	2.12

前述のヒトパルボウイルス B 19 とブタパルボウイルスの関係から、実施例 1～3 の膜に関しては、ヒトパルボウイルス B 19 の除去に適用した場合のウイルス除去性能は、ブタパルボウイルスの場合に匹敵した性能が確保されると推定しうる。また、同じく前述のウシ免疫グロブリンとヒト免疫グロブリンの関係から、実施例 1～3 で得られたウシ免疫グロブリンに関する高透過率は、実際のヒト免疫グロブリン製剤製造工程においても、同等以上のレベルで達成されるものと容易に推測できる。

すなわち、実施例 1～3 の膜はいずれも、ウィルス混入の危険性のある医薬品またはその原料としての生理活性物質溶液から、ヒト免疫グロブリン等の生理活性物質を実用的レベルで透過させ、ヒトパルボウイルス B 19 やポリオウィルスのような小ウィルスの除去を行い、より安全な製剤をもたらすことのできる優れた膜である。

[比較例 1～3]

実施例 1～3 と同様の方法で、比較例 1～3 の中空糸膜を製造した。ただし、セルロース銅アンモニア溶液及び凝固液(外液、内液) は表 3 に示す組成とした。

得られた中空糸膜の内径、膜厚、BP/γ、純水透過速度、ブタパルボウィルス LRV、ウシ免疫グロブリン透過率を第 3 表に示す。

ここで、バブルポイント、純水透過速度、ブタパルボウィルス LRV、ウシ免疫グロブリン透過率は、前記した方法で測定した。さらに、本比較例のバブルポイント測定も、実施例と同じく、界面張力γが 0.012 (N/m) であるパーフルオロカーボンを湿潤液体として、膜の耐圧範囲で測定可能な低圧力試験条件を作りだし、気体には窒素を用いておこなった。

第 3 表の結果から、比較例 1 と比較例 3 の膜は、ヒト免疫グロブリンに対する高透過性を有しているが、ヒトパルボウイルス B 19 等の小ウィルス除去性は有していないことが推定される。また、比較例 2 の膜はヒトパルボウィルス

B 19 等の小ウィルスを高除去できると推定できるが、ヒト免疫グロブリン透過性に関しては、実用レベルの性能を有しているとは考えられない。

[表 3]

		比較例 1	比較例 2	比較例 3
セルロース濃度 (wt%)		6.96	7.5	7.5
外液組成	アセトン濃度(wt%)	37.5	37.5	30
	アンモニア濃度(wt%)	0.1	0.1	0
内液組成	アセトン濃度(wt%)	53	45	53
	アンモニア濃度(wt%)	0.65	0.65	0.65
原液吐出速度 (ml/min)		3.65	3.00	3.65
内径 (μm)		330	330	345
膜厚 (μm)		35	26	34
BP/ γ (MPa/(N/m))		69.6	137	105
純水透過速度 *1)		308	59	122
ブタパルボウイルスLRV*2)		0.2	>4.9	2.1
ブタパルボウイルスLRV*3)		0.1	>5.1	2.1
ウシ免疫グロブリン透過率 (%)		100	55	>95

* 1) 膜面積 1 m^2 あたりリットル/h/0.1MPa

* 2) ウィルス溶液濾過量 0~5 (リットル/ m^2)

* 3) ウィルス溶液濾過量 50~55 (リットル/ m^2)

[産業上の利用の可能性]

本発明の膜によれば、ウィルス混入の危険性のある医薬品またはその原料の生理活性物質溶液の濾過において、実用的なレベルにおいて、ヒトパルボウイルスB19やポリオウィルスのような小ウィルスの高い除去性能（例えば、ヒトパルボウイルスB19の対数除去率3以上の持続）と生理活性物質の高い透過性能（例えば、ヒト免疫グロブリンの透過率70%以上）を同時に達成することができ、より安全な製剤をもたらす技術を提供することができる。

請 求 の 範 囲

1. バブルポイントBP (MPa) と界面張力 γ (N/m) との比 (BP/ γ) が110以上であり、かつ、単量体の占める割合が80%以上のウシ免疫グロブリンの透過率が70%以上であることを特徴とする生理活性物質溶液用濾過膜。

2. 0～5リットル/ m^2 濾過時と50～55リットル/ m^2 濾過時におけるブタパルボウィルス対数除去率がいずれも3以上であり、かつ、単量体の占める割合が80%以上であるウシ免疫グロブリンの透過率が70%以上であることを特徴とする生理活性物質溶液用濾過膜。

3. バブルポイントBP (MPa) と界面張力 γ (N/m) との比 (BP/ γ) が110以上で、0～5リットル/ m^2 濾過時と50～55リットル/ m^2 濾過時におけるブタパルボウィルス対数除去率がいずれも3以上であり、かつ、単量体の占める割合が80%以上であるウシ免疫グロブリンの透過率が70%以上であることを特徴とする生理活性物質溶液用濾過膜。

4. 膜内部の孔構造において、孔径の対数標準偏差 σ_g が2.0以下である領域部の厚みが3 μm ～90 μm である、請求項1ないし請求項3のいずれかに記載の濾過膜。

5. 純水透過速度が膜面積1 m^2 当たり70～200リットル/h/0.1MPaである、請求項1ないし請求項4のいずれかに記載の濾過膜。

6. 膜表面にスキン層を持たない、請求項1ないし請求項5のいずれかに記載の濾過膜。

7. 膜が5 μm ～100 μm の厚さを有する、請求項1ないし請求項6のいずれかに記載の濾過膜。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05548

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ B01D69/02, A61K39/395, A01M1/02 540

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ B01D69/02, A61K39/395, A01M1/02 540

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2000	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 9-301886, A (Green Cross Corporation), 25 November, 1997 (25.11.97), Claims 1 to 3; Column 4, lines 13 to 45; Column 5, lines 1 to 7; Column 5, line 23 to Column 6, line 9 (Family: none)	1-7
A	JP, 4-371221, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 24 December, 1992 (24.12.92), Claim 1; Column 1, lines 10 to 41; Column 7, line 32 to Column 8, line 39; Table 1 (Family: none)	1-7
A	JP, 10-337445, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 22 December, 1998 (22.12.98), Claims 1 to 3; Column 4, line 44 to Column 10, line 12; Table 4 (Family: none)	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not
 considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing
 date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
 cited to establish the publication date of another citation or other
 special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
 means
 "P" document published prior to the international filing date but later
 than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
 priority date and not in conflict with the application but cited to
 understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive
 step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered to involve an inventive step when the document is
 combined with one or more other such documents, such
 combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 September, 2000 (11.09.00)

Date of mailing of the international search report
19 September, 2000 (19.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ B01D69/02, A61K39/395, A01M1/02 540

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ B01D69/02, A61K39/395, A01M1/02 540

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2000年
 日本国登録実用新案公報 1994-2000年
 日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 9-301886, A (株式会社ミドリ十字) 25. 11月. 1997 (25. 11. 97) 【請求項1】～【請求項3】、第4欄第13行～第45行、第5欄第1行～第7 行、第5欄第23行～第6欄第9行 (ファミリーなし)	1-7
A	JP, 4-371221, A (旭化成工業株式会社) 24. 12月. 1992 (24. 12. 92) 【請求項1】、第1欄第10行～第41行、第7欄第32行～第8欄第39行、表1 (ファミリーなし)	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 09. 00

国際調査報告の発送日

19.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山田 泰之

4D

2928

電話番号 03-3581-1101 内線 3419

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 10-337445, A (旭化成工業株式会社) 22. 12月. 1998 (22. 12. 98) 【請求項1】～【請求項3】 , 第4欄第44行～第10欄第12行, 表4 (ファミリーなし)	1-7